

La biotecnología como herramienta para la propagación, conservación y el mejoramiento genético del guayabo

Biotechnology as a tool for propagation, conservation and genetic breeding in guava

*Juliette Valdés-Infante Herrero**, *Narciso Nerdo Rodríguez Medina***, *Lien González****,
*Josefa Bárbara Velázquez Palenzuela*****, *Domingo Rivero Rodríguez*****,
*Darío Gaspar Sourd Martínez*****, *Felina Martínez González*****,
*Julio Alberto Rodríguez Rodríguez******

Resumen

Las técnicas biotecnológicas contribuyen positiva y significativamente en los programas de propagación, conservación y mejoramiento de las especies vegetales. Dentro de éstas, el cultivo de tejidos, el desarrollo de mapas de ligamientos genéticos y de QTLs y la detección de genes de interés han demostrado ser de gran utilidad para los mencionados propósitos. En este sentido, se estandarizó una técnica para la multiplicación *in vitro* de la forma silvestre de guayabo en tres fases de cultivo: establecimiento, multiplicación de propágulos y enraizamiento. La misma constituye una vía de utilidad para la propagación, la conservación de germoplasma y el mejoramiento genético en la especie. Además, se estandarizó un método de conservación a corto-mediano plazo. Por otra parte, se construyó un mapa de ligamiento genético para la especie empleando marcadores AFLP y SSR. Los 11 grupos del mapa de ligamiento genético y los 50 QTLs relacionados con caracteres vegetativos y de calidad interna y externa del fruto, constituyen el punto de partida para el clonaje de genes de interés agrícola y la implementación futura de la selección asistida por marcadores en el guayabo. De igual forma, las 176 secuencias candidatas a genes de resistencia (RGL) y del desarrollo de la planta (MADS-box y HOME0-box) detectadas pueden ser de gran utilidad en la saturación del mapa de ligamiento referido, el estudio de la variabilidad presente en el cultivo, así como en la solución de problemas relacionados con el rendimiento, la producción y la resistencia a estrés biótico y abiótico.

Palabras clave: *in vitro*, mapa de ligamiento, QTLs, RGL, genes del desarrollo, guayabo.

Abstract

Biotechnologies contribute positively and significantly in the propagation, conservation and breeding programs of many plant species. From them, tissue culture, linkage maps and QTLs detection for interesting genes have been proved to be of great utility for these purposes. In this sense, a technique for *in vitro* multiplication of wild guava was standardized in three culture phases: establishment, multiplication and rooting. This technique constituted a useful way for propagation,

* Bióloga, PhD en Ciencias Biológicas, Investigador Agregado, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. Ciudad de La Habana. Cuba, C.P. 11300. Telefax: (53-7) 216794, Teléfono: (53-7) 293585, mejoramiento@iift.cu

** Biólogo, PhD en Ciencias Biológicas, Investigador Titular, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. Ciudad de La Habana. Cuba, C.P. 11300. Telefax: (53-7) 216794, Teléfono: (53-7) 293585, isabel.garcia@infomed.sld.cu

*** Bióloga, PhD en Fitopatología, Investigador Auxiliar, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. liengonza@fbio.uh.cu

**** Técnico. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. Ciudad de La Habana. Cuba, C.P. 11300. Telefax: (53-7) 216794, Teléfono: (53-7) 293585.

***** Especialista. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave. 7ma. No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa. Ciudad de La Habana. Cuba, C.P. 11300. Telefax: (53-7) 216794, Teléfono: (53-7) 293585.

germplasm conservation and genetic breeding in the specie. A method for short-medium term conservation was also standardized. On the other hand, a genetic linkage map was constructed for the specie using AFLP and SSR markers. The 11 groups of the genetic linkage map and the 50 QTLs related with vegetative and internal/external fruit characters constitute the starting point for genes cloning of agricultural interest and the future implementation of markers assisted selection in guava. Also, the 176 candidate sequences for resistance-gene-like (RGL) and plant development (MADS-box and HOMEObbox) genes detected can be of great utility in linkage map saturation, variability studies in this crop, as well as in the solution of problems related with yielding and resistance to biotic and abiotic stresses.

Key words: *in vitro*, linkage map, QTLs, RGL, development genes, guava.

Recibido: mayo 25 de 2012

Aprobado: noviembre 21 de 2012

Introducción

Las técnicas biotecnológicas contribuyen positiva y significativamente en los programas de propagación, conservación y mejoramiento de las especies vegetales, y el guayabo no constituye una excepción. Dentro de éstas, el cultivo de tejidos, el desarrollo de mapas de ligamientos genéticos y de QTLs y la detección de genes de interés han demostrado ser de gran utilidad para los mencionados propósitos.

El cultivo de tejido de plantas es una herramienta importante tanto para estudios básicos como aplicados, así como para propósitos comerciales. Además de contribuir a la propagación acelerada de plantas, se ha convertido en una técnica básica y ventajosa para la biotecnología moderna, incluyendo la producción de plantas transgénicas (Loyola, 2008). Dentro de la familia *Myrtaceae*, se ha intentado establecer la propagación *in vitro* de diferentes frutales, entre los que se encuentran especies del género *Eucalyptus* (Contreras *et al.*, 2008), *Calycolpus moritzianus* (Contreras *et al.*, 2008), *Eugenia squarrosa* Ekman & Urban y *E. subdisticha* Urban (Montalvo *et al.*, 2010); *Psidium guajava* L. (Rodríguez *et al.*, 1994; 1995; 1998; Concepción, 2008), *Psidium salutare* (H. B. K.) Berg. (Sotolongo *et al.*, 1998) y *Feijoa sellowiana* Berg. (Oltramari *et al.*, 1988). La conservación de germoplasma en el guayabo se encuentra limitada generalmente a colecciones de campo (González *et al.*, 1996-97), aunque se han desarrollado semillas sintéticas a partir de embriones somáticos, lo que favorece la conservación de la especie (Yadav *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha referido que la principal aplicación de los marcadores moleculares en el mejoramiento de las plantas está vinculada a la construcción de mapas genéticos y a la asociación de QTLs, para la selección indirecta del material vegetal a través de marcadores ligados a un carácter de importancia económica (Persson, 2001). Recientemente se estableció el primer

mapa de ligamiento en guayabo (Valdés-Infante *et al.*, 2003), el cual se ha seguido saturando con otros marcadores de ADN y donde se han asociado caracteres de importancia económica (Valdés-Infante, 2009).

Además, durante las últimas décadas, se ha hecho referencia a la detección de diferentes genes involucrados en la resistencia y el desarrollo de las plantas para algunos cultivos (Fonseca de Oliveira *et al.*, 2005). La identificación de secuencias candidatas a estos tipos de genes se ha referido recientemente en el guayabo (González *et al.*, 2010).

El presente trabajo tiene como objetivo mostrar la utilidad de herramientas biotecnológicas tales como i) las técnicas de cultivo *in vitro*; ii) los marcadores moleculares para la construcción de mapas de ligamiento genético y de loci de herencia cuantitativa (QTLs); y (iii) los arreglos (arrays) para la detección de secuencias candidatas a genes de resistencia (RGL) y del desarrollo de la planta (MADS-box y HOMEObbox), como métodos complementarios para la propagación, conservación y mejoramiento del guayabo.

Técnicas de cultivo *in vitro*

El progreso de las técnicas de cultivo *in vitro* hacen razonable el considerar al cultivo de tejidos como una herramienta complementaria valiosa. De hecho, ya se encuentra incluida en distintos niveles de los programas de mejoramiento de muchas especies de plantas (Doré, 1987).

El cultivo de tejidos tiene dos papeles importantes en los frutales: facilitar la multiplicación de las plantas y como vía para la creación de nuevas fuentes de variabilidad genética en los cultivares existentes. Para esto último, la variación somaclonal resulta de gran interés (Mullins, 1987).

La hibridación convencional puede presentar barreras naturales de compatibilidad sexual, lo cual limita su uso. Tres tecnologías emergentes han demostrado su potencial para superar estas limitaciones: el rescate de embriones, la fusión de protoplastos y la introgresión vía transformación de genes (Valdés-Infante, 2009).

Por otro lado, la alta variabilidad genética observada en los cultivos *in vitro*; así como las correlaciones que se presentan en ocasiones con la respuesta “*in vivo*” de un hospedero frente a la infestación con un patógeno, corroboran el uso de estas técnicas en los programas de mejoramiento encaminados a la búsqueda de resistencia (Wenzel *et al.*, 1987).

Dentro de la familia *Myrtaceae*, se ha intentado establecer la propagación *in vitro* de diferentes frutales, sin embargo, hay poca información referente a la conservación a corto-mediano plazo utilizando estos métodos biotecnológicos. En el guayabo, Yadav *et al.*, (2008) y Manoj *et al.*, (2010a) han referido que el desarrollo de semillas sintéticas puede ser empleado en la propagación, el almacenamiento a corto plazo; así como en el intercambio y distribución de germoplasma, tomando como base los trabajos desarrollados por ellos en Estados Unidos. En este sentido, en Cuba se han desarrollado algunos trabajos enfocados mayormente a lograr algunos de los propósitos mencionados anteriormente.

Tal es el caso de la determinación hecha por Rodríguez *et al.*, (1999), de los medios de cultivo más eficientes que garantizan una conservación a mediano plazo del guayabo (tabla 1). El manejo de las sustancias que componen el medio de cultivo ha sido eficaz para la conservación *in vitro* de frutales. La reducción de los macroelementos y la fuente de carbono a la mitad de

la concentración original del medio de Murashige y Skoog (1962), así como el empleo de la cuarta parte de la concentración de reguladores del crecimiento (Bencilaminopurina - BA y Ácido 1 naftil acético - ANA) propuestos por Rodríguez *et al.*, (1999) para el establecimiento del cultivo *in vitro* de la especie, puede prolongar el período de conservación a seis meses a la temperatura de 21°C. Gil *et al.*, (1998) obtuvieron resultados similares en la conservación *in vitro* del cultivar criollo de papayo (*Carica papaya* L.) en Cuba.

Por otra parte, las técnicas de micropropagación son utilizadas por los mejoradores de plantas como medida de seguridad ante la pérdida de materiales vegetales, para una rápida introducción de nuevos genotipos de interés, como un sistema eficiente y confiable para la selección de caracteres cuya expresión es afectada por el ambiente, así como una forma económica y fácil de mantener genotipos, entre otras (Doré, 1987).

El establecimiento *in vitro* de este frutal se ha caracterizado por un bajo porcentaje de explantes asépticos y un alto porcentaje de explantes necróticos; dado posiblemente como consecuencia de la oxidación de compuestos fenólicos presente en los tejidos. En Cuba, Rodríguez *et al.*, (1999) detectaron que puede disminuirse la oxidación de los explantes utilizando material etiolado y realizando el cultivo de los mismos en la época de invierno. De igual forma, en Egipto, Youssef *et al.*, (2010) validaron la utilización de la sílica para cubrir los explantes y sus extremos, como método para prevenir la oxidación por fenoles.

La edad de la planta y el tipo de explante, son factores que pueden afectar el establecimiento *in vitro* de este cultivo (Amin y Jaiswal, 1987; Ramírez y Salazar, 1997), lo cual se ha reportado también para otras es-

Tabla 1. Formulaciones empleadas para la conservación *in vitro* de *P. guajava* L (Rodríguez *et al.*, 1999). Medio basal de Murashige y Skoog (1962).

Trat.	Macro-Nutrientes (%)	Micro-Nutrientes (%)	Vitaminas (%)	Sacarosa (%)	C.A. (%)	Reguladores (mg/L)	
						BA	ANA
1	50,0	100,0	100,0	1,5	0,0	0,25	0,025
2	50,0	100,0	100,0	1,5	1,0	0,25	0,025
3	50,0	50,0	100,0	1,5	0,0	0,25	0,025
4	50,0	50,0	100,0	1,5	1,0	0,25	0,025

C.A. Carbón activado; BA: 6 bencil aminopurina; ANA: Ácido 1 naftil acético

pecies de frutales como por ejemplo la fresa (*Fragaria ananassa* Duch. Guedes) (Litz y Conover, 1981). El empleo de soluciones estériles antes y durante la desinfección superficial, así como su incorporación al medio de cultivo, posibilita en gran medida el control de la oxidación (Amin y Jaiswal, 1987; Collado et al., 2002).

Por ejemplo, Ocampo y Núñez (2007), en Colombia, han empleado el hipoclorito de sodio para reducir o eliminar la contaminación de los explantes una vez inoculados en los medios de cultivo. De igual forma, en Venezuela han evaluado el empleo del hipoclorito de sodio o de calcio, cloruro de mercurio y el nitrato de plata, unido al benomil y la rifampicina, para el control de los microorganismos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de este cultivo y de *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz (Ramírez y Salazar, 1998; Ramírez et al., 1999; 2000). En contraste, Liu y Yang (2011) realizaron una desinfección inicial de los explantes en solución de peróxido al 15%, seguido de su cultivo en medio Murashige-Skoog suplementado con Polivinilpirrolidona (PVP), como uno de los métodos que se emplean en Estados Unidos para disminuir la carga contaminante.

En Cuba se han empleado diferentes antioxidantes para solucionar este problema en *Psidium salutare* (Delgado y Froirian, 1994) y en *Psidium guajava* (Rodríguez et al., 1994, 1995; Concepción et al., 2005). Además, se han realizado estudios para determinar la microbiota epifítica y los contaminantes fungosos presentes en las plantas a emplear como fuente de explantes tanto en el guayabo como en otros representantes de Myrtaceae (Acosta et al., 2002, 2007; Hernández y González, 2010). Esta información es de gran valor para la metodología a emplear en la desinfección del material de partida. Para el caso de la India, donde también han partido de semillas como fuente explante, se ha demostrado la efectividad de combinar soluciones de peróxido y ácidos fuertes como el clorhídrico y el sulfúrico en la reducción al 0% de los rangos de contaminación (Ali et al., 2012). Trabajos en China desarrollados por Lee y Yang (1994) y Lee (1998) combinan la elección del material en determinada época del año, junto con la aplicación de ácido ascórbico y ácido cítrico antes de la desinfección con hipoclorito de sodio, como alternativas para el control de la contaminación por hongos durante el establecimiento *in vitro* del guayabo.

Por otra parte, se ha informado que el origen topográfico del explante influye sobre la oxidación del tejido vegetal, ya que en el guayabo se ha detectado menor cantidad de fenoles totales cuando provienen de bro-

tes de raíces con respecto al resto de la planta (Concepción et al., 2005; Concepción, 2008).

Respecto al tipo de explante, se ha logrado establecer la propagación *in vitro* de este frutal a partir de plantas jóvenes de semillas e injertadas (Loh y Rao, 1989; Rodríguez et al., 1994; 1995; 1998; Mohamed et al., 1995); así como de plantas adultas (Amin y Jaiswal, 1987; Manoj et al., 2010a; Liu y Yang, 2011; Mora, 2012) en países como Cuba, Estados Unidos, India y Costa Rica. Para ello, se han utilizado brotes apicales y explantes nodales; sin embargo, los últimos han mostrado un mejor comportamiento, debido posiblemente a la ausencia de dominancia apical, a que las yemas axilares se encuentran en estado de desarrollo más avanzado y a que los brotes apicales sean más susceptibles a daños durante el proceso de desinfección superficial (Amin y Jaiswal, 1987).

De igual forma, Rodríguez et al., (1999) resaltaron la efectividad de los medios suplementados con 1,0 mg/L de BA; 1,0 mg/L de BA + 0,3 mg/L de AIA (ácido indolacético); 1,0 mg/L de BA + 0,5 mg/L de AIA ó 1,0 mg/L de BA + 0,1 mg/L de ANA para el establecimiento del cultivo *in vitro* en el guayabo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Amin y Jaiswal (1987) en esta especie y con Sotolongo et al., (1998) en *Psidium salutare*. Loh y Rao (1989) señalaron que en plantas en estado juvenil cultivadas *in vitro*, las concentraciones más adecuadas son las de 0,1 mg/L de BA para brotes apicales y 0,5 mg/L del regulador para explantes nodales. Las respuestas diferenciadas a la concentración de reguladores pueden deberse al tipo de explante, a las condiciones de cultivo de las plantas donadoras y al grado de juventud.

A su vez, durante la fase de enraizamiento *in vitro*, se obtienen buenos resultados cuando al medio basal MS diluido a la mitad de su concentración original se le añaden concentraciones bajas de auxinas (0,2 mg/l). La adición de carbón activado a razón de 1 g/L también incrementa el porcentaje de enraizamiento y favorece el crecimiento de las raíces (Rodríguez et al., 1999).

En Cuba se han puesto a punto métodos para la micropropagación del cultivar "Enana Roja Cubana" (Pérez et al., 2002), así como la técnica de embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos utilizando, incluso, sistemas de inmersión temporal (Vilchez, 2001; Vilchez et al., 2002; Concepción et al., 2004; Concepción, 2008; Kessel, 2008). Igualmente, Chowdhury y Yadav (2008), Manoj et al. (2010 a y b), Manoj et al., (2012) y Madhu et al., (2011) promueven la micropropagación y la embriogénesis somática como métodos

complementarios a emplear en la conservación, propagación y mejoramiento de este cultivo en la India. A su vez, en Colombia, se ha validado la organogénesis directa a partir de segmentos nodales como una forma de propagación clonal *in vitro* de accesiones éliticas (Ocampo y Núñez, 2007); mientras que en México se indujo la formación de callos organogénicos a partir de hojas, hipocótilos y embriones, siendo las hojas las de mejores resultados (Beas y Batista, 2010). De igual forma, en Estados Unidos Yang *et al.*, (2005) han trabajado en el establecimiento de un protocolo eficiente que permita la regeneración *in vitro* de callos embrionarios de guayabo. Esta línea de trabajo, basada en la embriogénesis somática, también ha sido desarrollada en Brasil por Ferreira y Yoshimitsu (2009) a partir de semillas inmaduras de cultivares éliticos.

Por otra parte, Hao (2008) y Hao *et al.*, (2009) realizaron un estudio sobre la tolerancia a las bajas temperaturas y la aclimatación al frío de genotipos de guayaba, teniendo en cuenta que la temperatura constituye la principal limitante para ampliar la comercialización de este frutal a otras regiones menos tropicales. Basado en estos resultados, Biswas *et al.*, (2004, 2007) han empleado el cultivo *in vitro* como herramienta para la búsqueda de tolerancia al frío en el guayabo mediante transformación genética. El objetivo fundamental de este trabajo es disminuir los costos que representan el cultivar este frutal en casas de cultivo en regiones con un clima templado. El experimento consistió en evaluar la transferencia de los genes CBF1, CBF2 y CBF3, relacionados con la tolerancia al frío, mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en tejidos de plantas de guayabo. Para esto emplearon vectores plasmídicos con marcadores para genes de resistencia a antibióticos y el gen GUS para confirmar la eficiencia de la transformación. Las plantas mostraron resistencia al marcador para antibiótico seleccionado, lo que indica que estos genes fueron transferidos al genoma del guayabo y habla a favor de la efectividad del método empleado.

De igual forma, Zamir *et al.*, (2009) combinaron la inducción de mutaciones con el cultivo *in vitro* como uno de los métodos a emplear para el mejoramiento genético de características con interés comercial en el guayabo. Esto permite disminuir el tiempo, la laboriosidad, los recursos a utilizar y el personal involucrado en el mejoramiento de los frutales perennes por métodos clásicos. El estudio incluye el análisis de la sensibilidad de segmentos de tallo, brotes leñosos y semillas desarrolladas *in vitro* a diferentes dosis de radiación. Las semillas provenientes de los frutos irradiados (M1) fueron sembradas y su descendencia fue evaluada también (M2). Para estas últimas se detectó

variación en un grupo de características de interés comercial que fueron mejoradas a partir de la utilización de este método biotecnológico para complementar el mejoramiento clásico de este frutal.

En la actualidad, el establecimiento y estandarización de protocolos *in vitro* con tejidos de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera fundamental para procesos de micropropagación masiva y para facilitar la tecnología de transformación genética (Ocampo y Núñez, 2007).

Marcadores moleculares para la construcción de mapas de ligamiento genético y de loci de herencia cuantitativa (QTLs)

Muchos de los caracteres de mayor interés agronómico son de naturaleza cuantitativa y su control genético está determinado por múltiples *loci* con distintos efectos y con complejas interacciones genéticas y ambientales. Por ello se hace necesaria, como herramienta básica de trabajo, la generación de múltiples poblaciones segregantes para los caracteres de interés y la construcción de mapas genéticos. Estos mapas son imprescindibles en el caso de caracteres cuantitativos y absolutamente necesarios cuando se quiere conocer la localización cromosómica y el efecto relativo de cada uno de los genes responsables de estos caracteres (Valdés-Infante, 2009).

Un mapa de ligamiento genético es una representación gráfica del ordenamiento de los innumerables *loci* detectados tanto por marcadores morfológicos, bioquímicos, como moleculares basados en el ADN a lo largo del cromosoma. La distancia entre los *loci* es expresada en centimorgan (cM), el cual representa la frecuencia de recombinación entre los *loci* (1cM=1% de recombinación) (Sunil, 1999).

El desarrollo de la Biología Molecular en los últimos años ha generado múltiples marcadores moleculares con los que saturar rápidamente un mapa genético. Para abordar la construcción de los mapas genéticos se dispone de numerosas clases de marcadores moleculares. Los marcadores dominantes, como los RAPD (Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar) y los marcadores de alta eficacia como los AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados), permiten el análisis de un elevado número de *loci* por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, constituyendo una herramienta clave para la construcción, de forma rápida, del armazón de los mapas genéticos en el que se localizan los marcadores codominantes; así como en la saturación de regiones genómicas de interés (Grando *et al.*, 2000).

Por otro lado, los marcadores codominantes como RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción), SSR (Secuencias Simples Repetidas), CAP (Polimorfismo de la Restricción Aleatoria), EST (Secuencias Blanco Expresadas) y SNP (Polimorfismo de Nucleótidos Simples), aunque analizan un sólo locus por experimento, son más informativos al permitir diferenciar las variantes alélicas de los *loci* analizados. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, son menos numerosos que los dominantes. Conjuntamente con los marcadores dominantes comunes para ambos progenitores (segregación 3:1), permiten identificar grupos de ligamiento homólogos entre los mapas de ambos parentales (Cabezas *et al.*, 2001).

La Selección Asistida por Marcadores (MAS) está basada en el concepto de que es posible inferir la presencia de un gen a partir de la presencia de un marcador que esté estrechamente ligado al gen de interés (Sunil, 1999). Para cumplimentar este objetivo, es necesaria la saturación de las regiones del mapa de ligamiento. La saturación es un término relativo y el grado de saturación depende del propósito para el cual se construyó el mapa. El grado de saturación es la proporción del genoma que será cubierta por los marcadores, a una densidad tal que el máximo de separación entre los marcadores moleculares no sea mayor que unos cuantos cM (Sunil, 1999).

En los programas de mejoramiento de especies perennes como la mayoría de los frutales, la estrategia de mapeo utiliza el pseudocruzamiento prueba o pseudoretrocruzamiento en dos sentidos, el cual involucra a una progenie F1 debido a la dificultad de obtener generaciones avanzadas. La técnica aprovecha el elevado nivel de heterocigosidad que muestran algunas especies para construir mapas genéticos estudiando la segregación de marcadores en progenies F1. Esta generación F1, derivada del cruce controlado entre dos plantas, se asemeja a una progenie F2 o a un retrocruzamiento de los modelos clásicos de los cultivos anuales. Se denomina pseudocruzamiento prueba en dos sentidos porque permite obtener, de forma simultánea, los mapas genéticos de ambos progenitores, empleando marcadores que segregan 1:1 en la progenie, o sea, presentes en heterocigosis en uno de los progenitores y ausentes en el otro (Cabezas *et al.*, 2001; Siviero *et al.*, 2002).

Aunque muchas de las investigaciones iniciales sobre mapeo genético han sido desarrolladas en especies cereales, estas técnicas pueden tener un gran impacto en los programas de mejora de especies frutales; los cuales presentan, entre sus principales limitaciones, el largo

período juvenil que extiende por un buen número de años la evaluación de caracteres importantes del fruto y del desarrollo de la planta (Moore y Durham, 1992; Clegg *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 2004; Sanchez-Pérez *et al.*, 2004).

Por otra parte, una aplicación directa de los mapas de ligamiento genético ha sido el seguimiento de genes con importancia económica a través de marcadores moleculares. Caracteres tales como productividad, calidad, maduración y resistencia a estrés biótico y abiótico están controlados por un número relativamente grande de *loci*, cada uno de los cuales tiene una pequeña contribución positiva o negativa al valor fenotípico final del carácter. Estos *loci* son llamados "*loci* de caracteres cuantitativos" (QTLs, Quantitative Trait Loci); los cuales muestran una variación continua en el fenotipo y son llamados caracteres poligénicos, debido a que la expresión fenotípica final está determinada por la variación genética en un gran número de *loci* que son modificados por efectos ambientales (Sunil, 1999).

El objetivo del mapeo genético es identificar marcadores con herencia simple que se encuentren muy cercanos a los factores genéticos que afectan los caracteres cuantitativos, o sea, a los QTLs (Ochieng *et al.*, 2007). Con los marcadores moleculares es posible asignar una posición en el cromosoma a los QTLs individualmente, determinar el tipo y la magnitud del efecto de cada QTL e incluso cuál parental posee el alelo positivo (Sunil, 1999). Esta localización está basada en crear una asociación estadística entre el marcador y el QTL, proceso que detecta esta asociación en función de la distancia entre el marcador y el QTL (Ochieng *et al.*, 2007). La habilidad de encontrar una relación entre un QTL y un marcador molecular depende de la magnitud del efecto del QTL en el carácter, el tamaño de la población evaluada y la frecuencia de recombinación entre el marcador y el QTL (Cummins, 2005; Malmberg y Mauricio, 2005).

La identificación y utilización de estos marcadores asociados a caracteres de interés agronómico permitirá la evaluación precoz y la selección de individuos portadores del carácter deseado (Clegg *et al.*, 2005). Por otro lado, las regiones del genoma donde se localizan los *loci* responsables de dichos caracteres y los marcadores asociados a los mismos, constituyen el punto de partida para iniciar el clonaje posicional de genes que controlan estos caracteres mediante saturación de la región que contiene el gen con marcadores flanqueantes. Una vez identificados y caracterizados, estos genes pueden emplearse en estrategias de ingeniería genética para introducir dichos caracteres en especies

heterocigotas y mantener la combinación génica de los genotipos de interés (Georgiady *et al.*, 2001).

Estudios de este tipo se han desarrollado en algunos miembros de la familia a la cual pertenece el guayabo (*Myrtaceae*), tales como los géneros *Eucalyptus* (Bundock *et al.*, 2000; Morana *et al.*, 2002; Brondani *et al.*, 2006; Myburg *et al.*, 2004; Grattapaglia *et al.*, 2012) y *Corymbia* (Shepherd *et al.*, 2008). Para el caso específico del guayabo, los trabajos realizados que involucran la aplicación de esta herramienta moderna para asistir los programas de mejoramiento clásicos son limitados.

Valdés-Infante *et al.*, (2003) reportaron el primer mapa de ligamiento desarrollado para el guayabo basado en la utilización de los marcadores moleculares AFLP y en la caracterización de parentales y descendientes del cruce 'Enana Roja Cubana' x 'N6'. El mismo contenía 11 grupos de ligamiento que probablemente se correspondan con el número de cromosomas haploide de la especie, una longitud total de 1349cM y 15 QTLs detectados para caracteres vegetativos. Posteriormente, se incrementó el número de combinaciones de cebadores AFLP empleadas a 48 y se desarrolló un segundo mapa que contenía 220 marcadores mapeados, una longitud total de 1379cM y 21 QTLs relacionados con caracteres del fruto (Rodríguez *et al.*, 2005).

Esfuerzos adicionales enfocados a continuar con la saturación del mapa establecido conllevaron al uso no sólo de marcadores AFLP sino también de microsatélites para establecer homologías entre los mismos. Esto permitió mapear un total de 393 marcadores AFLP y SSR, para una longitud de 1983cM, y 50 QTLs identificados para caracteres vegetativos y del fruto (Rodríguez *et al.*, 2005; Valdés-Infante, 2009) (figura 1).

Recientemente, se ha trabajado en el desarrollo de otros dos mapas de ligamiento para los cruces 'Enana Roja Cubana' x 'Suprema roja' y 'Enana Roja Cubana' x 'Belic L-207', basados en marcadores AFLP y SSR. Esto tiene como objetivo identificar marcadores comunes que permitan homologar grupos de ligamiento para la construcción futura de un mapa integrado para la especie. Para esto se han referido combinaciones de cebadores SSR que pueden ser de utilidad para lograr este propósito (Ritter *et al.*, 2010a).

También se han detectado QTLs para los tres cruces de guayabo realizados en el 2001 en Cuba. La localización de los mismos en los respectivos mapas de ligamiento constituye un reflejo de las correlaciones detectadas entre los caracteres analizados e incluso están cercanos a marcadores SSR, lo que garantizará un proceso de selección más eficiente du-

rante la implementación futura de la selección asistida por marcadores para este cultivo (Ritter *et al.*, 2010b).

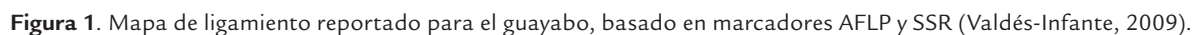
En este sentido, en la India también se han realizado trabajos similares. Tal es el caso del estudio realizado por Padmakar (2012) con marcadores SSR tomando como base dos genotipos de guayabo con diferencias contrastantes para un grupo de caracteres de interés comercial. Como resultado, se desarrolló un mapa de ligamiento que puede ser útil para la identificación de QTLs, el clonaje posicional y la identificación de marcadores ligados a caracteres de importancia para el mejoramiento y la producción.

Arreglos (arrays) para la detección de secuencias candidatas a genes de resistencia (RGL) y del desarrollo de la planta (MADS-box y HOME0-box)

La hibridación de arreglos (macro y microarrays) de ADN se ha convertido en una herramienta poderosa para la evaluación de cientos de genes simultáneamente, en diferentes tejidos u órganos y bajo distintos estímulos. Esto permite contar con un análisis general del perfil de expresión diferencial de los genes en un tejido específico y en un momento o condición dado (Golkary *et al.*, 2007).

Existen referencias en la literatura acerca de la correlación que se establece entre el patrón detectado por los arreglos y los resultados observados en algunos métodos utilizados para chequear la presencia de secuencias de ADN o ARN (Félix *et al.*, 2002). Tal es el caso de la técnica de Southern-blot, la cual se emplea de forma rutinaria en la Biología Molecular para confirmar la presencia de una secuencia de ADN en una muestra de ADN (Mergaert *et al.*, 2003).

Durante las últimas décadas, se ha hecho referencia en la literatura a la detección de algunos genes involucrados en la resistencia y el desarrollo de las plantas para algunos cultivos (Liu y Ekramoddoullah, 2003; Hake *et al.*, 2004; Fonseca de Oliveira *et al.*, 2005). Los genes MADS-box y los HOME0-box codifican para reguladores transcripcionales de funciones biológicas diversas e importantes. En las plantas, los genes MADS-box regulan el desarrollo de la flor, el fruto, la hoja y las raíces; mientras los HOME0-box actúan como interruptores que determinan el destino de una célula, su crecimiento y desarrollo (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000). Por otra parte, el conocimiento de la base genética relacionada con los genes que confieren resistencia a plagas y enfermedades puede contribuir a elevar la efectividad de los programas de mejoramiento (Richter y Ronald, 2000).



En este sentido, González *et al.*, (2010) detectaron un total de 117 clones positivos para secuencias RGL, 37 para MADS-box y 22 para HOME0-box en el guayabo con la utilización de los macroarreglos y sondas heterólogas para la identificación de estos genes. El número de clones positivos detectados sugiere la existencia de cierto grado de diversidad para estos tipos de secuencias en este frutal. Los perfiles de Southern- blot confirmaron lo observado por macroarreglos y mostraron múltiples bandas, como era de esperar teniendo en cuenta que éstas son familias multigénicas (Mergaert *et al.*, 2003). Resultados similares se han observado en otros representantes de Myrtaceae, como los pertenecientes al género *Eucalyptus* (Leland y Podila, 2004).

Estas 176 secuencias candidatas a genes RGL, MADS-box y HOME0-box pueden ser utilizadas como sondas para identificar la presencia de otros genes de este tipo en el género e incluso en la misma familia. También pueden ser convertidas en marcadores moleculares para ser utilizados en una futura selección asistida por marcadores en el guayabo, e incluso en el clonaje de nuevos genes, elevando de esta forma la eficiencia del programa de mejoramiento para este frutal. La utilidad de estos cebadores debe ser evaluada en el futuro en las tres poblaciones de mapeo empleadas en la construcción y saturación del mapa de ligamiento y la asociación a QTLs (Valdés-Infante *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005; Valdés-Infante, 2009).

A su vez, el conocimiento del funcionamiento de estos genes contribuye a estudiar los procesos del desarrollo responsables de la gran diversidad de formas encontradas en las especies de plantas. Esto puede conllevar a la mejora en caracteres de interés comercial como tiempo de floración y de cosecha, altura de la planta, forma del fruto, número de semillas, entre otros. Respecto a esto, González *et al.*, (2010) observaron, en la colección cubana de guayabo características, fenotípicas similares a las que se refieren para genotipos mutantes de genes MADS-box y HOME0-box en *Arabidopsis thaliana*. Los mismos mostraron diferencias en cuanto a características relacionadas con la flor, la hoja, el fruto y la altura de la planta. Es necesario realizar estudios posteriores con estas accesiones para corroborar que estas variaciones están relacionadas con el posible patrón de expresión de estos genes en la especie.

Por otra parte, también se han dado los primeros pasos para la detección de genes o proteínas de interés en esta especie, con vistas a una futura transformación genética que involucre no sólo el mejoramiento de un grupo de variables sino también para la resistencia a estrés biótico y abiótico. Tal es el caso en México de

Hernández *et al.*, (2011); los cuales realizaron la caracterización de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en hojas de guayabo. Esta planta tiene múltiples funciones de utilidad para la medicina, por lo que esta es una línea de trabajo que comienza a explotarse para la búsqueda de bioproductos.

De igual forma, Agüero *et al.*, (2003) refirieron el aislamiento de un fragmento del ADNc ACC Oxidasa expresado durante la maduración del fruto del cultivar 'Enana Roja Cubana'. Esta enzima es clave en la biosíntesis del etileno, razón por la cual dicha enzima se selecciona para silenciar su actividad utilizando la tecnología del ARN antisentido unida a la transformación genética. El trabajo muestra por primera vez el aislamiento y la secuenciación de un fragmento de ADNc ACC oxidasa a partir de frutos maduros de guayaba enana con la perspectiva de ser usado para el futuro control de la biosíntesis de etileno en frutos de este cultivo. Esto constituye un aspecto de gran importancia si se tiene en cuenta que el guayabo es un fruto climático y de muy corta vida de anaquel, lo que dificulta las labores de poscosecha y comercialización (Valdés-Infante, 2009).

A su vez, Hao *et al.*, (2009) determinaron la acumulación de cuatro proteínas (69, 48, 23.5 y 17.4 kDa) en respuesta a las bajas temperaturas y dos proteínas (17.4 y 16 kDa) en respuesta al estrés por sequía durante un estudio sobre tolerancia y aclimatación al frío en Estados Unidos. Se pudo identificar una proteína en común (17.4 kDa) que se manifiesta tanto para la tolerancia al frío como al déficit hídrico, lo que sugiere que estos son procesos multifactoriales que involucran cambios fisiológicos y bioquímicos complejos y que, además, se solapan en su respuesta (Hao *et al.*, 2009).

Otro tanto fue referido por Manoj *et al.*, (2010) en un estudio, en la India, de regeneración de plantas de guayaba a partir de embriones desarrollados bajo condiciones de estrés a salinidad. En este caso, se produjo la acumulación de los aminoácidos Prolina y β Glicina a medida que aumentaban los niveles de sal en el medio, lo que sugiere que pueden jugar un papel importante en el ajuste osmótico de plantas de guayabo sometidas a este tipo de estrés abiótico (Manoj *et al.*, 2010).

Respecto a esta misma temática, en Venezuela se comienzan a dar también los primeros pasos relacionados con la puesta a punto de la metodología para el clonaje del gen que codifica para la enzima hidropéroxidoliasa, vinculada al olor de la fruta de guayaba (Valecillos y Fermín, 2010).

Muchos son los retos a los cuales se enfrenta en la actualidad el cultivo del guayabo en el mundo, relacionados fundamentalmente con la mejora en caracteres de interés y la tolerancia a estrés biótico y abiótico que limitan su comercialización a gran escala. Los métodos convencionales de mejoramiento tienen sus desventajas y barreras debido a la naturaleza altamente heterocigota de esta especie y el largo período juvenil que presenta por ser un frutal perenne, entre otras razones. Lo comentado en el presente trabajo pone de manifiesto la utilidad de las herramientas biotecnológicas como complemento para elevar la eficiencia en los trabajos de propagación, conservación y mejoramiento en el guayabo.

Conclusiones

La inclusión de las técnicas de cultivo *in vitro* en el programa de mejoramiento del guayabo permitirá elevar la eficiencia en la propagación, la conservación y el desarrollo de nuevas fuentes de variabilidad con resistencia a estrés biótico y abiótico.

La construcción de mapas de ligamiento y la asociación a QTLs mediante la utilización de los marcadores moleculares garantiza la reducción en recursos, tiempo y personal involucrados en la selección de genotipos élite en el guayabo.

Los análisis de expresión basados en arreglos y las hibridaciones de ADN con sondas heterólogas sobre genotecas permiten la detección de múltiples secuencias de genes de interés en el guayabo, facilitando de esta forma los trabajos de mejoramiento en el cultivo.

Bibliografía

- Acosta M., Alvarado Y., Cruz M., Leiva M., Delgado L. 2005. Micobiota epífita y contaminantes fungos del establecimiento *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. *Manejo Integrado de Plagas Agroecológicas*. 75: 60-63.
- Acosta M.; Alvarado Y., Caballero I. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungos del establecimiento *in vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotechnología Vegetal*. 2(2): 67-71.
- Agüero G., Rodríguez E., Díaz L., Bacallao N., Jiménez E. 2003. Aislamiento de un fragmento del ADNc ACC Oxidasa expresado durante la maduración del fruto de Guayaba Enana. *Biotechnología Vegetal*. 3(2): 187 – 189.
- Ali N., Mulwa R.M.S., Norton M.A., Skirvin R.M. 2012. Radical disinfestation protocol eliminates *in vitro* contamination in Guava (*Psidium guajava* L.) seeds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 91(3): 295-298.
- Alvarez-Buylla E. R., Pelaz S., Liljegen S.J., Gold S.E., Burgeff C., Ditta G.S.; Ribas de Pouplana L., Martínez-Castilla L., Yanofsky M. F.. 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred

before the divergence of plants and animals. *PNAS*. 97 (10): 5328-5333.

- Amin M.N., Jaiswal V.S. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 9 (3): 235-243.
- Beas R.C., Batista A. 2010. Induction and callus characterization from leaf, hypocotyls and embryos of *Psidium guajava* L. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 849: 231-234.
- Biswas B.K., Joshee N., Yadav A.K. 2004. Can agricultural biotechnology help Guava growing in temperate climate. *HortScience*. 39 (4): 861-871.
- Biswas B.K., Joshee N., Yadav A., Yadav A.K. 2007. Development and application of biotechnology in guava: a nutraceutical fruit. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 744: 267-276.
- Brondani R., Williams E.R., Brondani C., Grattapaglia D. 2006. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. *BMC Plant Biol*. 6(20): 13-19.
- Bundock P.C., Hayden M., Vaillancourt E.R. 2000. Linkage maps of *Eucalyptus globulus* using RAPD and microsatellite markers. *Silvae genetica*. 49(4-5): 223-232.
- Cabezas J.A., Cervera M.T., Cenís J.L., Zapater J.M.. 2001. Construcción de un mapa genético de AFLPs y microsatélites en *Vitis vinifera*. IV Reunión de Biología Molecular de Plantas. Toledo, España. P.10
- Chowdhury V.K., Yadav N.R., Shefali A., Yadav R.C. 2008. Plant regeneration in cultured nodal explants of guava (*Psidium guajava* L.) for micropropagation. *Proceedings of the Second International Guava Symposium*, Mérida-Aguas Calientes, México. p10.
- Clegg M.T., Chen H., Ashworth V. 2005. Assessing the genetic determination of valuable avocado traits using microsatellite (SSR) markers and quantitative trait locus (QTL) analysis. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*. University of California, Riverside, USA: California Avocado Commission, p: 38-43.
- Clegg, M; H. Cheng and V. Ashworth. 2004. Application of molecular markers to avocado improvement. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*. University of California, Riverside, USA: California Avocado Commission, p: 24-28.
- Collado R., Agramante D.; Pérez J.N., Pérez M., Gutiérrez O., Jiménez F., Ramírez D. 2002. Selección de líneas clonales de guayaba del cultivar Enana roja (EEA 18-40) para su uso en mejoramiento genético y propagación. *Biotechnología vegetal*. 2(4): 207-210.
- Concepción O., Nápoles L., Pérez A., Peralta N., Trujillo R. 2004. Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6(2): 54-61.
- Concepción O., Nápoles L., Pérez A., Hernández M., Peralta N., Trujillo R. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*. 26(1): 33-39.

- Concepción O. 2008. Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en el guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. 'Enana Roja Cubana'. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Cuba: Universidad de Ciego de Ávila. Centro de Bioplantas, p 114.
- Contreras I., Valecillos C., Almeida J., Fermín G. 2008. Micropropagation of autochthonous and exotic Myrtaceae in Venezuela. *Proceedings of the Second International Guava Symposium*, Mérida-Aguas Calientes, México. p 8.
- Cummins J. 2005. Marker Assisted Selective Breeding. *The Institute of Science in Society-ISIS*. Disponible en Web: <http://www.i-sis.org.uk/MAS.php>
- Delgado L., Floirian Y. 1994. Metodología para la propagación *in vitro* de *Psidium salutare* (H. B. K.) Berg. (Guayabita del Pinar). Trabajo de Diploma. Cuba: Centro Universitario de Pinar del Río, p 35.
- Doré C. 1987. Application of tissue culture to vegetable crop improvement. En: *Plant tissue and cell culture: proceedings of the Vth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, held at the University of Minnesota, USA*: Alan R. Liss, Inc. Pp: 419-432.
- Félix J., Duarte R.D., Jorge R.A., Arruda P., Menossi M. 2002. Using macroarrays containing sugarcane ESTs to identify aluminium-induced genes in maize. *Plant nutrition - Developments in Plant and Soil Sciences*. 92: 40-41.
- Ferreira E., Yoshimitsu S. 2009. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. *Rev. Bras. Frutic*. 31(2): 21-29.
- Fonseca de Oliveira B., Simões-Araújo J.L., Russo C., Margis R., Alves-Ferreira M. 2005. Unravelling MADS-box gene family in *Eucalyptus* spp.: A starting point to an understanding of their developmental role in trees. *Genetics and Molecular Biology*. 28: 501-510.
- Georgiady M., Descenzo R., Cain D.W., Irelan N. 2001. Linkage mapping and QTL mapping in grape. *Proceedings of Plant & Animal Genome Conference IX*. San Diego, California, USA. p 15.
- Gil V., Pérez J., Ortega R. 1998. Propagación y conservación *in vitro* de papayo. Resúmenes del III Encuentro de Biotecnología Vegetal. La Habana, Cuba. p 10.
- Golkari S., Gilbert J., Prashar S., Procunier J.D. 2007. Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnology Journal*. 5: 38-49.
- González G., Fuentes V., Rodríguez N., Torres M., Capote M., Cañizares J., Lima H., Orozco P. 1996-1997. Colecciones y recursos fitogenéticos en la Estación Nacional de Frutales de Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 16 (17): 123-134.
- González L., Becker D., Rodríguez N., Valdés-Infante J., Schwarz-Sommer Z., Rohde W. 2010. Detection of candidate genes for resistance and plant development in guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae*. 849: 241-245.
- Graham J., Smith K., Mackenzie K., Jorgenson L., Hackett C., Powell W. 2004. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 109 (4): 740-749.
- Grando M.S., Bellin D., Madini A., Stefanini M., Pozzi C., Velasco R. 2000. Construction of an AFLP and SSR genetic map of *Vitis* from an interspecific hybrid population. *Proceedings of Plant & Animal Genome Conference VIII*. San Diego, USA. p 10.
- Grattapaglia D., Vaillancourt R., Shepherd M., Thumma B., Foley W., Külheim C., Potts B., Myburg A. 2012. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. *Tree Genetics & Genomes*. 8(3): 463-508.
- Hake S., Smith H., Holtan H., Magnani E., Mele G., Ramirez J. 2004. The role of KNOX genes in plant development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20: 125-151.
- Hao W., Arora R., Yadav A.K., Joshee N. 2009. Freezing Tolerance and Cold Acclimation in Guava (*Psidium guajava* L.). *HortScience*. 44(5): 1258-1266.
- Hao W. 2008. Freezing tolerance and cold acclimation in guava (*Psidium guajava* L.). Thesis of Master of Science. Iowa State University. USA: 80p. Disponible en web: <http://lib.dr.iastate.edu/etd/11179>.
- Hernández Y., González M.E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. 31(4): 15-23.
- Hernández Y., Flores N., Cano L.M., Noa J.C., Díaz F. 2011. Caracterización de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en hoja de *Psidium guajava*. Memorias del 6to Simposio Interno de investigación y Docencia. Veracruz, México: Universidad Veracruzana. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, p 8.
- Kessel A. 2008. Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales*. 29(3): 15-23.
- Lee M.Y. 1998. Studies on Initial Shoot Tip Culture of Guava (*Psidium guajava* L.). Tesis de Maestría en Horticultura. Taichung, República de China (Taiwán): Universidad Nacional Chung Hsing. p 70.
- Lee M.Y., Yang Y.S. 1994. Studies on shoot tip culture of guava (*Psidium guajava* L.) *in vitro*. *Horticulture NCHU*. 19: 47-59.
- Leland J., Podila G. 2004. MADS-box Genes in Dioecious Aspen II: A Review of MADSbox Genes from Trees and Their Potential in Forest Biotechnology. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 10: 7-28.
- Litz R.E., Conover R.A. 1981. Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* L. explants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 792-794.
- Liu X., Yang G. 2011. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) on nodal explants of mature elite cultivar. *International Journal of Plant Biology*. 2(1): 10-19.
- Liu J.J., Ekramoddoullah A. 2003. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Mol Gen Genomics*. 270: 432-441.

- Loh C.S., Rao A.N. 1989. Clonal propagation of *Psidium guajava* L. from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 39: 31-39.
- Loyola V.M. 2008. Plant tissue culture: An intemporal set of tools. *Proceedings of Second International Guava Symposium*. Mérida-Aguas Calientes, México: p 9.
- Madhu K., Bajpai A., Chandra R., Kalim S., Kumar R. 2011. Somatic embryogenesis for crop improvement. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2(1): 54-59.
- Malmberg R. L., Mauricio R. 2005. QTL-based evidence for the role of epistasis in evolution. *Genetical Research*. 86: 89-95.
- Manoj K., Phulwaria M., Gupta A.K., Shekhawat N.S., Jaiswal U. 2012. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 111(2):259-264. DOI 10.1007/s11240-012-0190-1
- Manoj K., Asthana P., Jaiswal V.S., Jaiswal U. 2010a. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees*. 24(1): 1-12.
- Manoj K., Jaiswal V.S., Jaiswal U. 2010b. Regeneration of plantlets of guava (*Psidium guajava* L.) from somatic embryos developed under salt-stress condition. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32(6): 1055-1062.
- Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E. 2003. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol*. 132: 161-173.
- Mohamed Y., Barringer S.A., Schnell R. J., Splittstoesser W.E. 1995. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Reports*. 14(8): 525-528.
- Montalvo G., Quiala E., Matos J., Morffi H., de Fera A., Chávez M., de la O M., Balbón R., Pérez M. 2010. *In vitro* establishment and acclimatization of two threatened species of the genus *Eugenia* (Myrtaceae). *Acta Horticulturae*. 849: 235-240.
- Moore G.A., Durham R.E. 1992. Molecular Markers. En: *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. Editores: Hammerschlag F.A., Litz R.E. Pp: 105-140.
- Mora E. 2012. La guayaba. Boletín Técnico Quincenal de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. *Agro-al día*. 2(3): 1-6.
- Morana G.F., Thamarusb K.A., Raymond C.A., Qiua D., Urena T., Southerton S.G. 2002. Genomics of *Eucalyptus* wood traits. *Ann. For. Sci*. 59: 645-650.
- Mullins, G. M. 1987. Propagation and genetic improvement of temperate fruits: the role of tissue culture. En: *Plant Tissue and Cell Culture: Proceedings of the Vth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, held at the University of Minnesota, USA*: Alan R. Liss, Inc. Pp: 395-406.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15: 473-493.
- Myburg A., C. Voglc, Griffind A., Sederoff R., Whetten R. 2004. Genetics of Postzygotic Isolation in *Eucalyptus*: Whole-Genome Analysis of Barriers to Introgression in a Wide Interspecific Cross of *Eucalyptus grandis* and *E. globulus*. *Genetics*. 166: 1405-1418.
- Ocampo F., Núñez V.M.. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(1): 22-27.
- Ochieng J.W., Muigai A.W.T., Ude G.N. 2007. Localizing genes using linkage disequilibrium in plants: integrating lessons from the medical genetics. *African Journal of Biotechnology*. 6(2): 650-657.
- Oltamari A., Daquinta M., Dal vesco L.; Guerra M., Ducroquet J. 1998. Morfogénesis *in vitro* de *Feijoa sellowiana*. *Memorias del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal*. La Habana, Cuba: p 8.
- Padmakar B. 2012. Survey of Simple Sequence Repeat (SSR) markers in guava (*Psidium guajava* L.) genome; towards establishment of molecular genetic map of guava. *Proceedings of International Conference on Agricultural & Horticultural Sciences*. Hyderabad, India: p 10.
- Pérez A., Nápoles L., Concepción O., Trujillo R. 2002. Multiplicación *in vitro* de brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) var. Enana Roja Cubana EEA 18-40 obtenidos a partir de semillas. *Cultivos Tropicales*. 23(3): 57-61.
- Persson H. 2001. Estimating Genetic Variability in Horticultural Crop Species at different Stages of Domestication. Doctoral Thesis. Alnarp, Suecia: Swedish University of Agricultural Sciences, p 37. ISSN 1401-6249. ISBN 91-576-5838-2.
- Ramírez M.C., Salazar E.G. 1998. Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 15: 162-173.
- Ramírez M.C., Santos R.A., Isea F.R. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 17: 217-225.
- Ramírez M.C., León S., Urdaneta A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 16: 243-255.
- Ramírez M., Salazar E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 14: 497-506.
- Richter T.E., Ronald P.C. 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol. Biol*. 42: 195-204.
- Ritter E., Rodríguez N., Velásquez B., Rivero D., Rodríguez J.A., Martínez F., Valdés-Infante J. 2010b. QTL (Quantitative Trait Loci) analysis in guava. *Acta Horticulturae ISHS*. 849:193-202.
- Ritter E., Herran A., Valdes-Infante J., Rodriguez-Medina N., Briceño A., Fermin G., Sanchez-Teller F., O'Connor-Sanchez A., Muth J., J. Boike; Prüfer D., Santos C.A., Nunes dos Santos I.C., Rodrigues M.A., Risterucci A.M., Billotte N., Becker D., Rohde W. 2010a. Comparative linkage mapping in three guava mapping

- populations and construction of an integrated reference map in guava. *Acta Horticulturae ISHS*. 849: 175-182.
- Rodríguez N.N., Velásquez B. 1999. Propagación del guayabo. Informe final de proyecto. Propagación, mejoramiento y conservación de frutales cultivados bajo condiciones tropicales. CITMA. Ciudad de la Habana, Cuba: 70p.
- Rodríguez N.N., Valdés-Infante J., Becker D., Velásquez B., González G., Sourd D., Rodríguez J., Billotte N., Risterucci A.M., Ritter E., Rohde W. 2005. Characterization of guava accessions by SSR markers, extension of the molecular linkage map, and mapping of QTLs for vegetative and reproductive characters. *Acta Horticulturae ISHS*. 735: 201-216.
- Rodríguez N.N., Pérez L.O., Blanco M. 1994. Avances en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* L. Memorias de la VII Jornada Científica INIFAP-MINAG. Santiago de las Vegas, Cuba. p: 94-95.
- Rodríguez N.N., Rodríguez O.L., Blanco M., Silva J. 1995. Sobre la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* L. Memorias del I Simposio Internacional sobre Fruticultura Tropical y Subtropical. La Habana, Cuba. Pp: 143-144.
- Rodríguez N.N., Mas O., Capote M. 1998. Avances en la propagación *in vitro* de frutales cultivados bajo condiciones tropicales. Memorias del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana, Cuba. p: 107-108.
- Sanchez-Pérez R., Dicenta F., Martinez-Gomez P., Howad W., Arus P. 2004. Construction of a linkage map and QTL analysis of agronomic traits in almond using SSR markers. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 726: 89-92.
- Shepherd M., Kasem S., Lee D.J., Henry R. 2008. Mapping species differences for adventitious rooting in a *Corymbia torelliana* × *Corymbia citriodora* subspecies *variegata* hybrid. *Tree Genetics & Genomes*. Disponible en web: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11295-008-0145-1/fulltext.html>
- Siviero A., Cristofani M., Boava L.P., Machado M.A. 2002. QTL mapping linked to fruit set and seeds in *Citrus Sunki* vs. *Poncirus trifoliata* hybrids. *Rev. Bras. Frutic.* 24(3): 1-9.
- Sotolongo R., Gaeda G., Junco L., García M. 1998. Propagación masiva *in vitro* de *Psidium salutare* (H. B. K.) Berg. Memorias del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana, Cuba. p 163.
- Sunil K.L. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*. 17: 143-182.
- Valdés-Infante J. 2009. Utilización de caracteres morfoagronómicos y de marcadores de ADN para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. La Habana, Cuba. Universidad de la Habana, p 100.
- Valdés-Infante J., Becker D., Rodríguez N.N., Velásquez B., González G., Sourd D., Rodríguez J., Ritter E., Rohde W. 2003. Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. *J. Genet. & Breed.*, 57: 349-358.
- Valecillos C., Fermin G. 2010. Cloning and sequencing of the hydroxyperoxide lyase gene and genetic transformation of guava. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 849: 245-251.
- Vilches J. 2001. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en el guayabo (*Psidium guajava*) L. Cultivar. Enana Roja Cubana EEA 18-40. Tesis presentada en opción al título de Máster. Santa Clara, Villa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas -IBP, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas - UCLV, p 60.
- Vilchez J.A., Albany N.R., Gómez R., García L. 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 19(4): 20-28.
- Wenzel G., Bolik M., Deimling S., Debnath S.C., B. Foroughi-Wehr and R. Schuchmann. 1987. Breeding for disease resistant crop plants by cell culture techniques. En: *Plant tissue and cell culture: proceedings of the VIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, held at the University of Minnesota, USA*: Alan R. Liss, Inc. Pp: 343-358.
- Yadav A.K., Viji G., Joshee N., Biswas B.K., Baldwin E.A., Zee F. 2008. Guava biotechnology: Road toward enhancing plant cold hardiness and nutraceutical values of fruit. 2nd International Symposium on Guava and Other Myrtaceae. *Abstract book*. Merida, Mexico. p: 53-54.
- Yang G.; L. Zhongge; C. Niedziela and T. Asnate. 2005. *In vitro* callus initiation of guava. International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species. *Abstract book*. Daytona Beach, Florida, USA. p 160.
- Youssef M.A., El-Helw M.R., Taghian A.S., El-Aref H.M.. 2010. Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 849: 223-230.
- Zamir R., An N., Tariq Shah S., Mohammad T., Ahmad J. 2009. Guava (*Psidium guajava* L.) improvement using *in vivo* and *in vitro* induced mutagenesis. In: *Induced mutations in tropical fruit trees*. International Atomic Energy Agency IAEA TECDOC-1615. Vienna, Austria: IAEA Press, p 101-112. ISBN 978-92-0-102709-2. ISSN 1011-4289.